

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE *Bacillus coagulans* EN
PRODUCTO LISTO PARA CONSUMO HUMANO BASADO EN UNA
METODOLOGÍA FARMACÓPEICA**

JENIFER CAROLINA SERRANO FERREIRA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2022**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO DE *Bacillus coagulans* EN
PRODUCTO LISTO PARA CONSUMO HUMANO BASADO EN UNA
METODOLOGÍA FARMACOPEICA**

JENIFER CAROLINA SERRANO FERREIRA

TRABAJO DE GRADO

DIRECTOR, RAMON OVIDIO GARCIA Ph.d.

**TUTOR EMPRESARIAL
KEINER YOWANIS CERVANTES
JEFE VALIDACIONES**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PAMPLONA
2022**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado

Jurado

Jurado

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. MARCO REFERENCIAL	5
4.1. MARCO TEÓRICO	5
4.1.1. <i>Bacillus coagulans</i>	5
4.1.2. Características de <i>Bacillus coagulans</i>	5
4.1.3. Probiótico	6
4.1.4. Alimento funcional.....	8
4.1.5. Suplemento dietario	9
4.1.6. Validación de métodos analíticos microbiológicos	11
4.1.7. Parámetros estadísticos establecidos por procesos de validación de métodos cuantitativos.....	12
4.1.8. Farmacopea USP.....	13
4.1.9. Recuento bacteriano de probióticos.....	14
4.2. ANTECEDENTES.....	16
4.3. MARCO LEGAL.....	20
5. METODOLOGIA.....	22
5.1. LOCALIZACIÓN	22
5.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE REFERENCIA	22
5.2.1. Preparación del medio de cultivo Agar GYE II modificado.....	22
5.2.2. Preparación de la muestra (Ver anexo 2).....	23
5.2.3. Siembra e incubación de la muestra (Ver anexo 2).....	24
5.3. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN	24
5.3.1. Selección de las matrices alimentarias	24

5.4.	REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE <i>Bacillus coagulans</i>	25
5.5.	Estandarización del Inóculo	26
5.6.	DOPAJE DE LAS MUESTRAS	27
5.7.	PROCESO ANÁLITICO DE LA VALIDACIÓN	28
5.7.1.	Parámetros estadísticos	28
6.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	32
7.	RESULTADOS	34
7.1.	DETERMINACIÓN DE EXACTITUD DEL MÉTODO	34
7.2.	DETERMINACIÓN DE PRECISIÓN	36
7.2.1.	PRECISIÓN INTERMEDIA	37
7.2.2.	PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)	38
7.3.	DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD	39
7.4.	DETERMINACIÓN DE INCLUSIVIDAD	40
7.5.	DETERMINACIÓN DE EXCLUSIVIDAD	42
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
8.1.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE EXACTITUD	43
8.2.	RESULTADOS DE PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE REPETIBILIDAD, PRECISIÓN INTERMEDIA Y REPRODUCIBILIDAD	43
8.3.	RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD	44
8.4.	RESULTADOS DE EXCLUSIVIDAD E INCLUSIVIDAD	45
9.	CONCLUSIONES	46
10.	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	47
11.	GLOSARIO	48
12.	BIBLIOGRAFIA	50
	ANEXOS	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros estadísticos para métodos cuantitativos. Tomados de la USP 32	12
Tabla 2. Matrices alimentarias por categorías y sus respectivos Artículos.....	25
Tabla 3. Concentraciones del McFarland del Densicheck para la estandarización del inóculo.....	26
Tabla 4. Cronograma de actividades realizadas.....	32
Tabla 5. Determinación de la exactitud (Porcentaje de recuperación relativa) en cada matriz analizada, Matriz 1 Saviloe; Matriz 2 Galletas; Matriz 3 Azúcar; Matriz 4 Helado.	34
Tabla 6. Determinación del parámetro de repetibilidad del método analítico por un analista seis veces repetidas.	36
Tabla 7. Precisión intermedia evaluada para dos analistas en días diferentes.	37
Tabla 8. Precisión en términos de reproducibilidad del método analítico llevado a cabo por dos analistas en diferentes días.....	38
Tabla 9. Determinación de la linealidad en log UFC/mL de ocho niveles de concentración de <i>Bacillus coagulans</i>	39

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Esquema metodológico del dopaje de muestras a tres niveles de concentración (Alto, medio y bajo) de <i>Bacillus coagulans</i>	28
Ilustración 2. Esquema metodológico del ensayo del parámetro estadístico "Linealidad".	31
Ilustración 3. Linealidad de los datos en ocho puntos de dopaje la muestra a diferentes concentraciones de <i>Bacillus coagulans</i>	40
Ilustración 4. Macroscopía y microscopía de <i>Bacillus coagulans</i> .(A,B) Colonias características en agar GYE II modificado: Grandes, circulares, borde entero, de color crema.(C). Bacilos gram positivos.	41
Ilustración 5. Macroscopía y microscopía de <i>Lactobacillus acidophillus</i> en Agar GYE II Modificado (A y B) Colonias características pequeñas, blancas, opacas e irregulares. (C) Bacilo Gram positivo.	42

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Tabla de recolección de datos en bruto del recuento en placa de <i>Bacillus coagulans</i> en Agar GYE II Modificado.	56
Anexo B. Instructivo técnico para el recuento de <i>Bacillus coagulans</i> en Alimentos. <i>Merieux Nutriscience</i>	58
Anexo C. Metodología De Referencia Para El Recuento <i>Bacillus coagulans</i> en Suplementos Dietéticos (Farmacopea, 2022)	59

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, existe un interés creciente en la producción de alimentos nutraceuticos que promuevan una alimentación más saludable y reduzcan el riesgo de enfermedades, por lo que el uso de probióticos resulta ser uno de los componentes más representativos en los alimentos funcionales actuales. Según la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren diversos beneficios a la salud del huésped, ya sea humano o animal (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006*).

Microorganismos como *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp. *Propionibacterium* spp. *Streptococcus* spp. y algunas especies de *Saccharomyces* sp poseen un amplio historial de aplicación en alimentos por sus propiedades probióticas, pero estos no suelen sobrevivir en ambientes extremos durante el procesamiento. (Cao *et al.*,2020). Es por ello que, microorganismos capaces de producir esporas han resultado ser el foco de interés en la industria alimenticia, debido a su resistencia. Tal es el caso de bacilos esporulados no patógenos como *Bacillus coagulans*.

Las preparaciones comerciales de *Bacillus coagulans* generalmente se presentan en suplementos dietarios como esporas o células vegetativas en forma de polvo, tabletas o cápsulas (Majeed *et al.*, 2016), siendo las esporas la presentación más viable desde el punto de vista industrial. Actualmente es posible encontrar en el mercado diversos alimentos que contienen dicho probiótico como la pasta, chocolate, azúcares y helado (Cao *et al.*, 2020). No obstante, es habitual que estos alimentos no especifiquen la cantidad mínima de probiótico en sus etiquetas (Majeed *et al.*, 2016), por lo que en muchos casos son engañosos, ambiguos o confusos (Reyes *et al.*, 2017).

Las metodologías de análisis microbiológico estipuladas para el uso de probióticos como *Bacillus coagulans* en alimentos, no se encuentran especificadas estrictamente y tienden a abarcar cuestiones generales. No obstante, la Farmacopea estadounidense posee una guía monográfica para capsulas y suplementos dietarios que contienen *B. coagulans* y podrían de alguna manera ser un referente metodológico por sus altos estándares de calidad.

A este respecto, esta investigación busca validar una metodología para cuantificar *Bacillus coagulans*, presente en alimentos de consumo humano basado en una metodología farmacopéica estandarizada, esto con el fin de confirmar la presencia de células/esporas, viables del microorganismo en cualquier matriz alimentaria que lo contenga. Asimismo, que los fabricantes dispongan de resultados microbiológicos confiables sobre los productos e informen adecuadamente en sus etiquetas, garantizando la calidad y la salud pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Validar una técnica microbiológica para cuantificar *Bacillus coagulans* en muestras de alimento basada en una metodología farmacopéica.

2.2. Objetivos específicos

- Estructurar una metodología para la cuantificación de *B. coagulans* a partir de matrices alimentarias seleccionadas.
- Realizar el proceso de validación de la metodología para la cuantificación de *Bacillus coagulans* en alimentos.
- Analizar estadísticamente los datos arrojados por el proceso de validación del método analítico propuesto.

3. JUSTIFICACIÓN

En la producción de alimentos se ha visto un aumento en la adición de *Bacillus coagulans* como ingrediente probiótico que permite dar un valor agregado al producto ya que sugiere promover una alimentación más saludable. Con el fin de asegurar la calidad de estos productos existe la necesidad de identificar que estos microorganismos se encuentran presentes en el alimento y que cumplan con las cantidades viables sugeridas de al menos 10^7 UFC/g ó mL a 10^9 UFC/g ó mL, los cuales deben sobrevivir hasta el final de la vida útil del producto (*Codex Alimentarius Commission*. 2019).

Es por esta razón que en esta investigación se hace relevante desarrollar y validar una metodología que permita un recuento válido de células viables de *Bacillus coagulans* en diferentes matrices alimentarias comerciales, de manera que a través de análisis estadísticos se compruebe que el método a validar funciona dentro del alcance que proporciona el laboratorio prestador de servicios, para recuperar y reportar la carga del probiótico presente en el alimento.

La metodología propuesta se encuentra basada en una metodología farmacopéica estandarizada para cápsulas y suplementos dietarios que contienen *Bacillus coagulans* (Farmacopea USP, 2022). Este método supone para esta investigación, un enfoque de seguridad en términos de salud pública y confiabilidad en los resultados, ya que esta organización representa una entidad normalizadora que maneja altos estándares de calidad a nivel internacional.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. MARCO TEÓRICO

4.1.1. *Bacillus coagulans*

Es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas anaerobia facultativa, no patógena y productora de ácido láctico, pero no produce gas durante la fermentación. (Cao *et al.*, 2020). Este microorganismo ha sido reportado como generalmente seguro (GRAS) por Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y la Autoridad de seguridad Alimentaria de la Unión Europea (EFSA) y es reconocida por su potencial biotecnológico como probiótico vital de uso industrial debido a que previene trastornos gastrointestinales y con capacidad de equilibrar el microbiota intestinal (Konuray y Ergincaya., 2018).

Ante un análisis macro y microscópico del microorganismo se ha permitido detallar el perfil fisiológico y la morfología de las colonias, *Bacillus coagulans* produce esporas terminales elipsoidales (Konuray y Erginkaya, 2018). Se recupera fácilmente en agar GYE donde crece formando colonias con bordes lisos y uniformes, con un tamaño de 1 a 3 milímetros de diámetro, de color blanco o crema y las células vegetativas son en forma de bastoncillo (Farmacopea USP, 2022)

4.1.2. *Características de Bacillus coagulans*

La temperatura óptima de crecimiento para *B. coagulans* es de 35 °C a 50 °C y el pH óptimo de crecimiento es de 5,5 a 6,5. Otras cepas han reportado ser termófilas y anaerobias facultativas capaces de crecer a temperaturas de 60 °C a 65 °C a un pH de 6,2. No produce ningún tipo de reacción cuando se analiza su citotoxicidad en línea celular Vero, dado que estas no se hinchan, ni producen metabolitos

tóxicos, lo que indica ausencia de genes que codifiquen enterotoxinas similares a las de *B. cereus*. (Salvetti *et al*, 2016).

Aunque aún no existe una dosis estandarizada para el consumo de *Bacillus coagulans*, estudios realizados por Endres J.R. y colaboradores (2009) demostraron la seguridad de *B.coagulans*, que se comercializa como GenedenBC^{30TM} el cual no indica efectos mutagénicos ni genotóxicos. Esta toxicidad se evaluó durante 90 días en ratones en los que no causa letalidad, no produce toxicidad oral aguda y es bien tolerado. Los resultados arrojan un nivel sin efectos adversos superior a 1000mg/kg por día. Con una concentración de *B. coagulans* $1,36 \times 10^{11}$ UFC que equivale a $95,2 \times 10^{11}$ UFC para un ser humano de 70kg. El rango de dosis típica de consumo recomendada es de 100×10^6 (100 millones) a 3×10^9 (3.000 millones) de UFC al día, por lo que este dato representa un factor de seguridad que oscila entre 3.173 y 95.200 veces la dosis diaria recomendada.

La actividad probiótica de este microorganismo se encuentra asociada a mejorar la salud gastrointestinal. Se le ha atribuido efectos que incluyen disminución del dolor abdominal, mejorar la digestión, mejorar el síndrome del intestino irritable, disminución de la enfermedad de Crohn (Salvetti *et al.*, 2016), estimulación del sistema inmune y su actividad antimicrobiana frente a patógenos transmitidos por alimentos mediante la producción de bacteriocinas (Emad A., 2008).

4.1.3. Probiótico

El término probiótico es una palabra que significa “a favor de la vida” actualmente se usa para designar a microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren diversos beneficios a la salud del huésped, ya sea humano o animal (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2006).

La primera observación positiva acerca de los probióticos se designó por el ruso Eli Metchnikoff en sus trabajos investigativos en el Instituto Pasteur donde afirmó que “La dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora intestinal de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” (Mackowiak, 2013).

Tras los estudios realizados por Metchnikoff, se desencadenó la explotación industrial de los probióticos hasta nuestros días. Actualmente existen un sin número de investigaciones que demuestran la seguridad de los probióticos y sus beneficios a la salud por sus actividades antimicrobianas (Umar *et al.*, 2020), anticancerígenas (Ouwehand *et al.*, 2002) modular el sistema inmunológico y prevenir enfermedades gastrointestinales (Elahi *et al.*, 2008).

Los géneros de probióticos incluyen principalmente bacterias ácido lácticas como a *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Pediococci* spp, y *Lactococcus* spp, pero los más usados pertenecen a *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp. (Duc *et al.*, 2004) Particularmente *B. coagulans* es considerado como probiótico que, al igual que las bacterias ácido lácticas confieren beneficios a la salud con efectos nutricionales o terapéuticos, resisten al ambiente ácido del estómago, y colonizan el tracto intestinal donde interactúan con todo el microbiota de manera comensal, manteniendo el equilibrio en este hábitat dentro del huésped (Konuray y Erginkaya., 2018).

El uso de probióticos requiere de estudios científicos a fondo, control y mucho cuidado con su aplicación de manera que no ponga en riesgo la salud del consumidor. Por lo tanto, la FAO establece que se deben evaluar las propiedades mediante las siguientes directrices para examinar microorganismos probióticos:

- Para seleccionar una cepa para su utilización en humanos debe existir rigurosos ensayos *in vitro* y métodos de prueba que permitan predecir la función del microorganismo en humanos.

- Se debe clasificar taxonómicamente la cepa probiótica.
- Mediante informes científicos de ensayos *in vitro* se debe demostrar que efectos a la salud tiene el probiótico y los regímenes de dosificación mínima diaria para tal fin.
- El probiótico debe ser catalogado como seguro (GRAS) lo que implica que el microorganismo no sea resistente a antibióticos, que no transfiera genes o plásmidos.

4.1.4. *Alimento funcional*

Un alimento funcional o nutracéutico posee una apariencia de un alimento convencional, sin embargo, la diferencia está enmarcada en que los alimentos funcionales confieren beneficios a la salud y pueden reducir los riesgos de enfermedades crónicas, incluyendo las relacionadas con la salud intestinal más allá de una nutrición básica (Cencic y Chinwaru, 2010). Uno de los ejemplos más comunes de este tipo de alimentos es aquellos que tienen como ingredientes un cultivo de bacterias probióticas, en otras palabras, un nutracéutico es más que un alimento convencional pero menos que un producto farmacéutico. Internacionalmente no existe una definición aceptada para alimento funcional, por lo que cada país regula a su propio juicio. Generalmente los alimentos nutracéuticos son tomados como suplementos dietarios en muchos países (Télessy G., 2019). Existe en la literatura otras consideraciones que pueden definir un alimento funcional (Beltran M., 2016), tales como:

- Es un alimento (no una cápsula, no una tableta).
- Puede consumirse como parte de la dieta alimentaria.

- Tiene una función en particular cuando se consume, ya sea mejorar el sistema inmune, prevenir el riesgo de enfermedad, ralentizar el envejecimiento entre otros.

Es importante que existan estudios bien diseñados y ejecutados adecuadamente *in vitro*, de manera que confirmen que un alimento se puede catalogar como funcional (Beltran M., 2016). En cuestiones de seguridad del producto depende en última instancia de fabricante quién debe dar cumplimiento a la calidad e inocuidad (Télessy G., 2019).

4.1.5. Suplemento dietario

De acuerdo con el decreto 3249 de 2006 del Ministerio de salud y protección social en Colombia se define como suplemento dietario aquel producto que adiciona una fuente concentrada de nutrientes a la dieta diaria normal que pueden contener ingredientes como vitaminas, minerales, un aminoácido, oligoelementos, derivados de plantas y concentrados. Está destinado a ser consumidos vía oral en forma de píldora, cápsulas, tableta, polvo, o líquido. (*Food and Drug Administration, 2022*)

Estos productos pueden ayudar a obtener suficientes sustancias vitales necesarias para el funcionamiento del cuerpo, otros pueden reducir el riesgo de alguna enfermedad. Sin embargo, estos no pueden sustituir una alimentación diaria con comidas completas. A diferencia de un medicamento, los suplementos dietarios no están destinados a curar, diagnosticar, o como tratamiento para enfermedades, por lo que no es posible que en el etiquetado se hagan afirmaciones al respecto, por ejemplo: “Trata enfermedades del corazón”. Dichas afirmaciones son permitidas para medicamentos, mas no para suplementos dietarios.

Según el Instituto Nacional de Salud (NIH, 2020) muchos de los ingredientes activos de algunos suplementos dietarios pueden generar efectos adversos en el cuerpo tras su consumo por lo que se debe tener en cuenta el estado inmunológico y la competencia en del consumidor. Las reacciones más comunes se pueden dar cuando :

- Combinar el uso de suplementos con otros medicamentos
- Tomar demasiado suplemento como Vitamina A, Vitamina D o Hierro

En cuestiones de seguridad y control los suplementos dietarios no tienen los mismos requisitos estrictos de seguridad como se exige para medicamentos. (*American cancer society, 2021*). La FDA no se encuentra autorizada para revisar la eficacia y seguridad de los suplementos dietéticos antes de su comercialización, por lo que cada fabricante es responsable de garantizar la calidad e inocuidad de su producto antes de lanzarlo al mercado. No obstante, la FDA puede restringir su uso en la medida de que se registre que tal suplemento causa daño a la salud pública. (*Food and Drug Administration, 2017*).

Para garantizar la calidad de las empresas productoras y aquellas que comercializan suplementos dietéticos ya sean importados o exportados deben asegurar las buenas prácticas de manufactura y el respectivo registro sanitario del producto como lo exige la normativa nacional (en Colombia el INVIMA), ya que su cumplimiento permite evitar agregar ingredientes nocivos al producto, la contaminación, y un etiquetado inadecuado que comprometa la salud del consumidor (*National Institutes of Health, 2020*).

4.1.6. Validación de métodos analíticos microbiológicos

Una validación se refiere a “La Acción de comprobar, en concordancia con los principios de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), que cualquier procedimiento, proceso, material, actividad o sistema realmente conducen a los resultados esperados” (Resolución 1160 del Ministerio de salud y protección social, 2016), esto con el fin de asegurar que un laboratorio de investigación ya sea privado o público cumpla con altos estándares analíticos.

En los estudios de validación de métodos microbiológicos en alimentos suele inocularse un blanco con el organismo de interés si el microorganismo específico no se encuentra naturalmente en esos alimentos. Se usan aislados de una especie, cepa o serotipo en un cultivo puro. No se recomiendan cultivos mixtos debido a que otros microorganismos contaminantes ocasionan estrés para el microorganismo diana de interés (Feldsine *et al.*, 2002).

Se debe inocular cada producto seleccionado con el analito de interés a determinadas concentraciones sin superar el intervalo de trabajo del método. (B. Magnusson y U. Örnemark, 2016). En los alimentos contaminados intencionalmente son requeridos tres niveles de inóculo alto, medio y bajo y un control sin inocular. El nivel bajo debe estar en el límite de detección, los nivel medio y alto pueden ser entre una o dos unidades logarítmicas respectivamente (Feldsine *et al.*, 2002).

Las validaciones microbiológicas se encuentran internacionalmente estandarizadas por la *Association of Analytical Communities* (AOAC) (Smedt, 1998) y por la Organización Internacional de estandarización ISO bajo la serie 16140. Dichas organizaciones en sus estándares analíticos describen el desarrollo de métodos de validación en sus diferentes categorías: Validación a partir de métodos de referencia, validación de métodos alternativos, Validación originada por un laboratorio, Validación por otro(s) laboratorio colaborador (Comitte ISO/TC 34/SC 9WG, 2021).

4.1.7. Parámetros estadísticos establecidos por procesos de validación de métodos cuantitativos

Tabla 1. Parámetros estadísticos para métodos cuantitativos. Tomados de la USP 32, capítulo 1225.

Métodos cuantitativos	DESCRIPCIÓN
Exactitud	Calculado como el porcentaje de analito recuperado teniendo en cuenta la diferencia entre el valor obtenido y el valor real.
Precisión (Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad)	Repetibilidad: Coincidencia entre los resultados obtenidos en una muestra homogénea por un analista. Precisión Intermedia: Coincidencia entre los resultados del mismo laboratorio con distintos analistas. Reproducibilidad: Coincidencia en los resultados en diferentes condiciones (diferentes días, diferentes laboratorios etc.)
Linealidad	Es la capacidad del método de obtener resultados de prueba directamente proporcionales al analito en muestras y a un intervalo dado.
Límite de detección	Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra.
Límite de cuantificación	Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar.

Límite inferior y Robustez es aconsejable pero no fundamental	Se define como la capacidad del método analítico de no resultar afectado por pequeñas o deliberadas variaciones.
Inclusividad	Análisis visual de las colonias puras del microorganismo de interés.
Exclusividad	Análisis visual de microorganismos cuyas colonias o crecimiento son similares a las del microorganismo de interés y que puede presentar potencialmente una reacción cruzada pero que no se espera detectar mediante el método.

4.1.8. Farmacopea USP

La Farmacopea de los estados unidos (USP), es una organización sin ánimo de lucro que provee normas de productos farmacéuticos. Su objetivo principal es "Seleccionar entre las sustancias que tienen un poder medicinal, aquellas cuya utilidad esté plenamente establecida y a partir de ellas formar preparaciones y compuestos. Asimismo, debe distinguir, esos artículos mediante nombres convenientes y específicos a fin de evitar problemas o incertidumbre entre médicos y farmacéuticos".

En la actualidad, la USP desarrolla textos USP-NF que proporcionan métodos de análisis y normas para fármacos, productos biológicos, suplementos dietéticos y excipientes empleados en productos farmacéuticos. Dichos textos se comercializan legalmente en los EE.UU. y el mundo o están contenidos en artículos que se comercializan legalmente (Farmacopea USP, 2007).

Los probióticos auguran un avance significativo en la industria actual. Es por ello que la USP ha tenido gran interés en desarrollar estándares públicos para este tipo de microorganismos, en donde se incluya 1) dosificación de probióticos; 2) la posible necesidad de referencia de ADN genómico para pruebas de identificación; 3) técnicas de enumeración; 4) desarrollo de mejores prácticas en la industria; 5) Los desafíos de las pruebas de recuento; 6) Definir si las monografías se deben realizar por especie o cepas. Esto con el fin de cumplir con los requisitos de Buenas prácticas de manufactura y proteger la salud pública. (Yoo S., 2016)

Las monografías USP son documentos bien detallados acerca de un ingrediente, sustancia o preparación farmacéutica que incluyen su definición, preparación, etiquetado, almacenamiento y su respectivo criterio de aceptación. (Farmacopea USP, 2019). Específicamente, monografías USP enfocadas a especies de probióticos como *Bacillus coagulans* ya se han desarrollado para cápsulas y suplementos dietarios en donde se detalla el análisis de identificación basado en técnica de ADN y análisis con técnica de recuento en placa (Farmacopea USP, 2002).

4.1.9. Recuento bacteriano de probióticos

La cuantificación de probióticos viables en formulaciones comerciales representa un aspecto clave para garantizar la presencia del microorganismo que promueve un efecto beneficioso a la salud durante toda la vida útil del producto.

Hasta ahora el recuento en placa se sigue considerando el estándar de oro para estimar el contenido de cada ingrediente probiótico activo presente en el producto terminado ya que permite recuperar células viables que se encuentran presentes en el producto. El medio de cultivo más usados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas ha sido el agar Mann, Rogosa y Sharpe (M.R.S) es un medio que funciona

bien con alimentos donde los Lactobacilos son el grupo más abundante. Otro medio de cultivo como el agar Rogosa favorece preferentemente la recuperación de Bifidobacterias (Erkmen O., 2022). El agar GYE favorece a grandes rasgos el crecimiento de *Bacillus coagulans* permitiendo su crecimiento y la formación de sus colonias características.

Esta metodología ha demostrado tener un buen límite de detección. Los rangos de aceptación del número de unidades formadoras de colonias contable en placa son de 30 UFC -300 UFC y 25 UFC– 250 UFC (Sutton S., 2011). Este método es una estimación donde crecen células bajo las condiciones ambientales que se han de establecer en un ensayo. Se cuentan aquellas capaces de estar bien aisladas en la placa y pueden distinguirse como colonias de una o miles de células microbianas (Sutton S., 2011)

Hay dos tipos de técnicas de recuento en placa: Recuento por siembra en profundidad y recuento por siembra en superficie (Ramirez *et al.*, 2017).

- **Recuento en placa por siembra en profundidad:** Consiste en añadir el medio de cultivo fundido y estéril a 50 °C sobre la placa de Petri que previamente se ha sembrado con una cantidad específica de la muestra diluida. Cuando el agar se solidifica se incuba. Las colonias pueden crecer dentro del agar como en la superficie. Es utilizado comúnmente para el recuento de microorganismos anaerobios facultativos a microaerófilos.
- **Recuento en placa por siembra en superficie:** Se siembra un volumen de muestra sobre la superficie del medio de cultivo previamente servido en placa de Petri. Con este método las colonias crecen en la superficie del medio. Es usado comúnmente para el recuento de bacterias aerobias.

4.2. ANTECEDENTES

La normatividad asociada al uso de probióticos no se encuentra consensuada y difiere entre países. Por tanto, la asociación científica internacional de probióticos y prebióticos Alimentación animal (ISAAP) han trabajado junto a un grupo de expertos en todo el mundo para armonizar todos los aspectos relacionados con los probióticos y prebióticos, dar claridad a la ciencia sobre el término y el estudio de los mismos. (Swanson *et al.*, 2020).

El ISAAP, la FAO/OMS refieren los mismos criterios mínimos que determinan a un probiótico. Estos declaran realizar la validación científica de los beneficios que confiere a la salud humana, que el probiótico sea seguro para su uso, se requiere de un etiquetado apropiado que incluya la especie del microorganismo, la cantidad de microorganismo y dosificación diaria requerida para tal beneficio. (FAO/OMS 2006). Aunque los documentos oficiales describen dichos criterios, estos no especifican las metodologías a seguir para el cumplimiento de los mismos por lo que los fabricantes deben buscar métodos que les permita alcanzar los estándares de calidad microbiológica y protejan la salud del consumidor.

Generalmente los métodos para analizar probióticos como *Bacillus coagulans* están basados en recuento en placa en medios de cultivo ya que resultan apropiados para determinar las células probióticas viables, pues estas deben encontrarse “vivas” para su consumo ya sea en un medicamento, suplemento dietético o alimento. (Zaiwstowska A., 2015)

El documento de la notificación GRAS otorgada por la FAO (2019) para la cepa de *Bacillus coagulans* SNZ 1969 da nociones en su metodología sobre el medio de cultivo adecuado para recuperar dicho probiótico. Básicamente el medio de cultivo es líquido y se compone de ingredientes como peptona que actúa como fuente de nitrógeno, dextrosa como fuente de carbohidrato y “*steep Liquor*” como una fuente

de vitaminas. Seguidamente se deben homogenizar los ingredientes y ajustar el pH a 6 ya sea con Ácido Clorhídrico o Cloruro de Sodio. Luego, se debe esterilizar el medio en autoclave. Finalmente se inocula el medio de cultivo previamente preparado a partir de un cultivo *stock* de *Bacillus coagulans*. (*Food and Drug Administration*, 2019)

Kapse y colaboradores (2019) validaron la anotación funcional del genoma de *B. coagulans* HS243 donde revelan los atributos probióticos esenciales y beneficios a la salud al analizar genes marcadores como: ADI hidrolasa y proteínas de adhesión que le permiten sobrevivir y colonizar el tracto digestivo; Genes biosintéticos de aminoácidos lo que sugiere que la cepa puede usarse como suplemento nutritivo, genes productores de bacteriocina que destacan con el potencial de prevención de enfermedades gastrointestinales. (Kapse *et al.*, 2019)

Además de confirmar los beneficios a la salud tras el consumo de *Bacillus coagulans*, para los fabricantes e investigadores resulta importante tener en cuenta las condiciones apropiadas para el desarrollo del microorganismo de manera que permita optimizar su estabilidad a lo largo de la vida útil del producto. La literatura muestra que Misiou y colaboradores (2021) desarrollaron la validación de un modelo predictivo del efecto de temperatura, el pH y la actividad de agua sobre la cinética de crecimiento de *Bacillus coagulans* en cinco productos listos para el consumo (Misiou *et al.*, 2021).

El análisis se realizó teniendo en cuenta parámetros cardinales mínimos, óptimos y máximos para las tres variables temperatura, pH y actividad de agua. Los resultados de la validación indicaron un buen desempeño del modelo con sesgo general de 1,00 y factor de precisión de 1,12. Los autores indican que el modelo validado permite rededir eficazmente el crecimiento del probiótico y el riesgo de deterioro del alimento (Misiou *et al.*, 2021).

Las investigaciones de Konray y Erginkaya resultan relevantes pues recientemente han publicado diferentes artículos científicos que demuestran el potencial biotecnológico de *Bacillus coagulans* en alimentos. Entre sus estudios lograron evaluar la calidad de una pasta probiótica tipo *spagetti* a la cual le adicionaron la cepa de *Bacillus coagulas* GBI30. (Konray y Erginkaya, 2020)

Cabe destacar que la metodología de recuperación propuesta por los autores se encuentra bien descrita y permite obtener resultados confiables. En dicha metodología se describe la homogenización de 10 gr de la muestra en 90 mL de solución salina estéril, posteriormente se realizan diluciones seriadas las cuales se termizaron a 75 °C. Finalmente se sembraron en agar GYE e incubaron a 40 °C por 48 a 72 horas. Los resultados se obtuvieron por recuento en placa. En la investigación se obtuvo que *Bacillus coagulans* GBI-30 conservó su viabilidad durante la producción, cocción y almacenamiento de la pasta, demostrando así que tiene una alta supervivencia durante 6 meses. (Konray y Erginkaya, 2020)

Otras investigaciones de Konuray y Erginkaya (2021) revelan las características probióticas *in vitro* de *B. coagulans*, la cinética de muerte térmica de las cepas donde se evidencia la resistencia de los microorganismos al estrés a altas temperaturas, pH bajos, exposición a la bilis y lizosima, asimismo las características toxicológicas las cuales resultan ser nulas ya que no se identificaron genes productores de toxinas. Las fuentes de aislamiento de las cepas potenciales de *Bacillus coagulans* se obtuvieron a partir de alimentos (papas, pepinillos, maíz y tomates) y usando la metodología anteriormente descrita por los mismos autores (Konuray y Erginkaya, 2021).

Visualizando el contexto nacional, no es un tema ajeno la creciente aplicación de probióticos en alimentos funcionales. Según la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia la tendencia en el uso de probióticos se ha registrado en la medida en que se han solicitado patentes de productos novedosos para el

tratamiento y prevención de enfermedades gastrointestinales, por lo general son composiciones medicinales y alimentos funcionales (ej. derivados lácteos, cereales, galletas) que contienen Bacterias Acido Lácticas, pero no se registran documentos disponibles sobre el uso de *Bacillus coagulans*.

Algunas de las patentes solicitadas en Colombia le pertenecen a la Universidad de Concepción (Chile) en el 2013. La investigación describe la elaboración de un alimento granulado fortificado con probióticos para peces pequeños.

El procesamiento se da a partir de la creación de un biofermentador que contiene una fuente de carbono, se adiciona un cultivo de probióticos como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus damnosus*. Posteriormente se adicionan los nutrientes necesarios como harina de pescado, soya, salvado de trigo, aceite de pescado y almidón de maíz. Finalmente se da la formación y secado de los gránulos (Super Intendencia de Industria y Comercio de Colombia 2014).

En conclusión, es evidente que tanto consumidores, como los centros de investigación y la industria alimentaria han demostrado un gran interés en el uso de probióticos en alimentos funcionales por lo que cada día se conocen mejor los mecanismos de acción y nuevas alternativas de producción. Por eso, es necesario que las normativas y métodos analíticos establezcan mayor confianza en su consumo acercando los productos con su verdadero contenido.

4.3. MARCO LEGAL

En Colombia actualmente se cuenta con legislaciones que regulan el uso de probióticos en alimentos y se encuentra descritos en la resolución 333 de 2011 del Ministerio de Salud y la Protección Social “por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano” donde se incluye especificaciones para probióticos.

La norma incluye directrices para aquellos alimentos que declaran conferir propiedades a salud, tal es el caso de los probióticos los cuales ya han demostrado científicamente que mejoran la función digestiva.

Con base en las exigencias nacionales, tanto los fabricantes como el laboratorio prestador de servicios, deben ajustarse a la normativa atendiendo al cumplimiento de la misma, en pro de asegurar la inocuidad del alimento desde el punto de vista microbiológico.

En dicha resolución se encuentran los siguientes criterios de cumplimiento:

- El microorganismo debe permanecer vivo, no ser patógeno y sobrevivir en el tracto digestivo.
- El alimento debe contener bacterias viables durante la vida útil del alimento de al menos 1×10^6 UFC/g ó mL.

Adicional a esta resolución, la normatividad colombiana exige el cumplimiento del decreto 549 de 2001 del Ministerio de Salud y la Protección Social el cual establece los requerimientos para obtener la certificación de buenas prácticas de manufactura por parte de los laboratorios fabricantes de suplementos dietarios en plantas ubicadas en territorio nacional.

Esta investigación tiene en cuenta las normas nacionales que establecen la necesidad de la validación de los métodos analíticos en los laboratorios. Esto se describe en la Resolución 1160 de 2016 Ministerio de Salud y la Protección Social para el cumplimiento de Buenas prácticas de Manufactura y guías de inspección de laboratorios o establecimientos de producción de medicamentos, donde se exige validar cualquier procedimiento, proceso, métodos de prueba analíticos, entre otros, de manera que se permita comprobar que estos conducen a los resultados esperados.

Cabe destacar la Resolución 810 del 2021 del Ministerio de Salud y Protección social por la cual se dictaminan los requisitos técnicos para el etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos para consumo humano. Una normativa que relaciona el consumo de probióticos en alimentos y sus declaraciones sobre la salud a la hora de realizar el etiquetado y la cantidad de microorganismos viables que debe contener el producto terminado.

En términos de medidas de seguridad la autoridad sanitaria nacional correspondiente al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) es la entidad encargada de vigilar, controlar e inspeccionar los alimentos, medicamentos y suplementos dietarios conforme a las normativas anteriormente descritas, que de incurrir en incumplimientos de las normas, esta entidad será la encargada de imponer las respectivas sanciones.

5. METODOLOGIA

5.1. LOCALIZACIÓN

Laboratorio Tecnimicro (*Merieux Nutriscience*) prestador de servicios para el control calidad de medicamentos, cosméticos, productos naturales, alimentos y afines. Ubicado en Medellín, Antioquia, con más de 10 años de estar certificados en ISO 9001, acreditados en ISO/IEC 17025 y certificados en Buenas Prácticas de Laboratorio para medicamentos por el Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y Alimentos - INVIMA.

5.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE REFERENCIA

5.2.1. Preparación del medio de cultivo Agar GYE II modificado

- Se prepara previamente una solución traza de minerales que contiene: Cloruro de sodio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso (II) monohidratado, sulfato de zinc heptahidratado, sulfato de manganeso, sulfato de cobre (II), sulfato de cobalto (II).
- Se pesa y homogeniza 1 mL (por cada 1000 mL) de la solución traza de minerales junto con el medio agar glucosa extracto de levadura comercial.
- El medio se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min.

5.2.2. Preparación de la muestra (Ver anexo 2)

- Los empaques de las muestras de alimentos se sanitizan con alcohol al 70 %.
- Se transfiere 1 g o 1 mL de la muestra en una bolsa *Stomacher* estéril, se agrega 199 mL de diluyente peptona al 0,1 % estéril (se requiere 200 mL o 300 mL de volumen final) y se mezcla entre 150 rpm a 200 rpm en un *Stomacher*.
- Se comprobó el pH de las muestras $8,5 \pm 0,2$.
- Se transfiere 20 mL ó 30 mL de la suspensión homogenizada a un tubo de centrífuga cónico estéril de 50 mL con tapa.
- Se termiza la suspensión a 75 °C durante 30 minutos y luego se enfría inmediatamente en agua fría por debajo de 45 °C.
- Transferir 1,0 mL de la suspensión enfriada a un tubo de ensayo estéril con 9 mL de diluyente peptona y homogenizar.
- Repetir la dilución en una sucesión de tubos hasta que la dilución final contenga 30 UFC/mL.
- Las tres diluciones finales se utilizan para análisis de recuento en placa

5.2.3. Siembra e incubación de la muestra (Ver anexo 2)

- Siembra 1 mL en caja de Petri por profundidad, luego se vierte el medio GYE II Modificado.
- Se debe preparar en placa un control blanco de agar GYE II modificada y otra placa con un control de peptona.
- Las placas se incuban a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas

5.3. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE VALIDACIÓN

5.3.1. Selección de las matrices alimentarias

Se seleccionaron 4 matrices alimentarias. Cada una de ellas afirmaba contener el probiótico *B. coagulans*. Estos alimentos fueron: Matriz 1: Bebida a base de agua; Matriz 2 Galletas; Matriz 3 Azúcar; Matriz 4 Helado.

Tabla 2. Matrices alimentarias por categorías y sus respectivos artículos.

Categoría	Alimentos expendidos a base de agua	Chocolate productos de panadería y pastelería.	Chocolate productos de panadería y pastelería	Leches y productos lácteos sometidos a tratamientos térmicos
Tipo	Bebida con probióticos	Galletas saladas, panes y galletas	Galletas, Chocolates, pasteles, miel, azúcar, siropes de caramelo	Productos lácteos pasteurizados
Artículo				

5.4. REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE *Bacillus coagulans*

La preparación de la suspensión microbiana del probiótico se realizó a partir de un liofilizado en polvo de una cepa nativa pura de *Bacillus coagulans*. Se tomó 1 g del liofilizado y se homogenizó en agua peptonada al 0,1 % hasta un volumen final de 200 mL.

La suspensión fue termizada a 75 °C en baño maría por 30 minutos y luego sometida a choque térmico en agua fría por debajo de 45 °C. Posteriormente se realizó una

siembra masiva en superficie (100 μ L) por triplicado en Agar GYE II modificado y se incubó a 40 °C \pm 2 °C por 48 horas en anaerobiosis.

5.5. Estandarización del Inóculo

Después de la activación previa del microorganismo en agar GYE II modificado, se tomó una asada de colonias para obtener la suspensión celular de 15×10^8 ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) del patrón 0,5 de la escala McFarland midiendo la turbidez con el Kit estándar *Densicheck*.

Tabla 3. Concentraciones del McFarland del *Densicheck* para la estandarización del inóculo.

Patrón Escala McFarland	Concentración bacteriana (UFC/mL)	Densidad óptica teórica a 580 nm
0.5	$1,5 \times 10^8$	0.125
1	3×10^8	0.25
2	6×10^8	0.50
3	9×10^8	0.75
4	12×10^8	1.00
5	15×10^8	1.25

Seguidamente se diluyó secuencialmente el patrón 0,5 de McFarland hasta alcanzar la concentración 10^1 para posteriormente determinar si la concentración del patrón McFarland se encontraba realmente en $1,5 \times 10^9$ UFC/mL.

Luego de las diluciones, se sembró las tres últimas de manera que se obtuvieran los siguientes recuentos en unidades formadoras de colonia UFC: 10^1 :1 UFC - 10

UFC; 10²: 11 UFC - 99 UFC; 10³: 100 UFC – 999 UFC. Así se confirmó que se había partido desde una concentración inicial de 1,5 x 10⁹ UFC /mL.

5.6. DOPAJE DE LAS MUESTRAS

Las muestras se pesaron y homogenizaron en un volumen final de 200 mL como se describe en el numeral 5.2.1 del método analítico de referencia.

Se fortificó cada una de las muestras con 3 niveles de concentración de *Bacillus coagulans* por triplicado, usando las tres últimas diluciones del inóculo previamente estandarizado en la escala McFarland (nivel alto entre 70 UFC - 80 UFC; nivel medio entre 15 UFC - 20 UFC ; nivel bajo hasta 10 UFC).

Cada nivel se determinó aplicando la siguiente ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

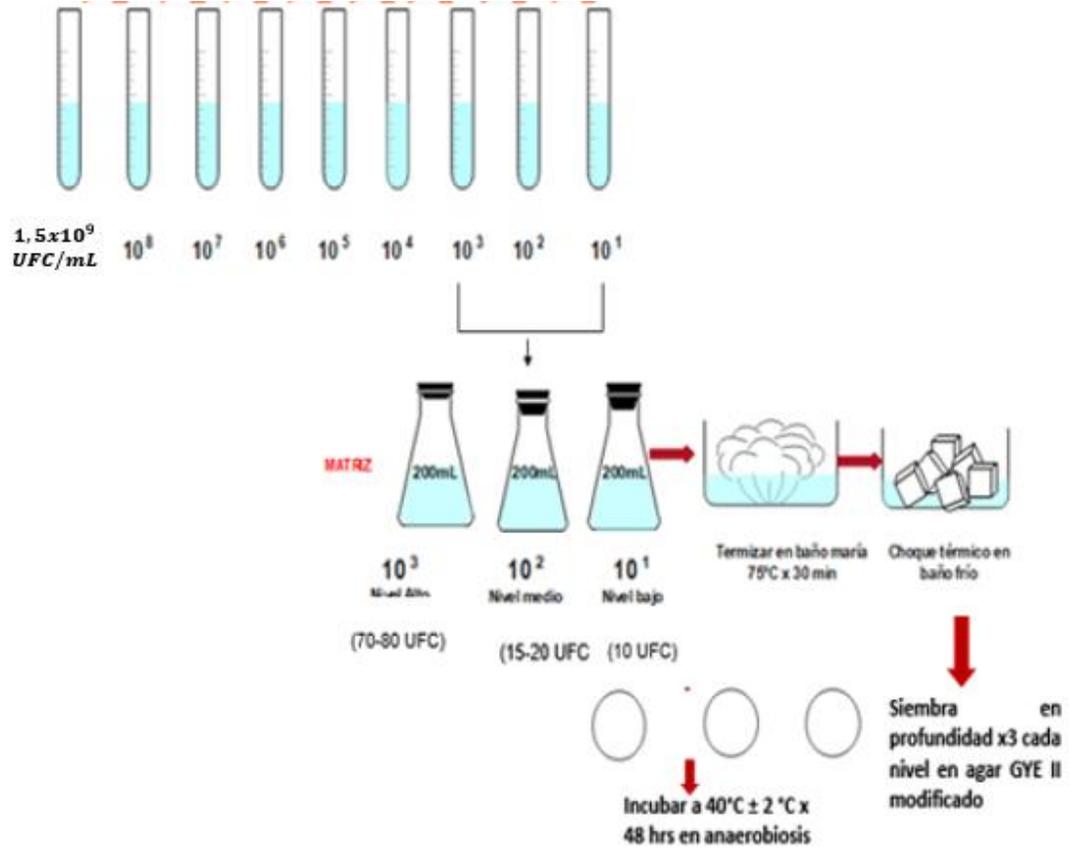
$$V_1 = \frac{(C_2)(V_2)}{C_1}$$

Sabiendo que: C1 es la concentración en UFC del nivel McFarland, V1: Volumen (X) inicial; C2: Concentración en UFC del nivel final deseado; V2: Volumen final.

Posteriormente las muestras fueron termizadas y sometidas a choque térmico como indica el numeral 5.2.1.

Finalmente se sembró cada muestra con sus respectivos niveles en Agar GYE II modificado como se describe en el numeral 5.2.2.

Ilustración 1. Esquema metodológico del dopaje de muestras a tres niveles de concentración (Alto, medio y bajo) de *Bacillus coagulans*.



5.7. PROCESO ANÁLITICO DE LA VALIDACIÓN

5.7.1. Parámetros estadísticos

Cada muestra se pesó, homogenizó, termizó y sembró como se describe en el numeral 5.2.1.

- **Determinación de Exactitud**

Cada matriz fue contaminada intencionalmente a tres niveles de contaminación con la suspensión del microorganismo *Bacillus coagulans* como se describe en el numeral 5.2. De estas muestras se obtuvieron los valores experimentales.

Simultáneamente se procesaron muestras con suspensiones de *Bacillus coagulans* en los mismos tres niveles de concentración en diluyente peptona al 1 % para un volumen final de 200 mL. Estas muestras representaron el valor verdadero de las concentraciones del microorganismo.

- **Determinación de la precisión**

Se utilizó la muestra más homogénea. Esta muestra se pesó y se homogenizó siguiendo el protocolo de la metodología de referencia 5.2.1

Seguidamente las muestras se doparon a un nivel medio de concentración (entre 15 UFC/mL a 20 UFC/mL) a partir de la suspensión de *Bacillus coagulans* obtenida de la estandarización del inóculo.

Luego la muestra se termizó y se sometió a choque térmico como se describe en el numeral 5.2.1.

Finalmente, se realizaron siembras en agar GYE II modificado por triplicado por dos analistas en dos días diferentes. Así, se determinó la precisión en términos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

- **Determinación de linealidad**

Se pesó y homogenizó ocho veces la muestra más homogénea siguiendo la metodología 5.2.1.

Seguidamente se doparon las muestras en ocho niveles de concentración de *Bacillus coagulans* previamente estandarizado por la escala de McFarland.

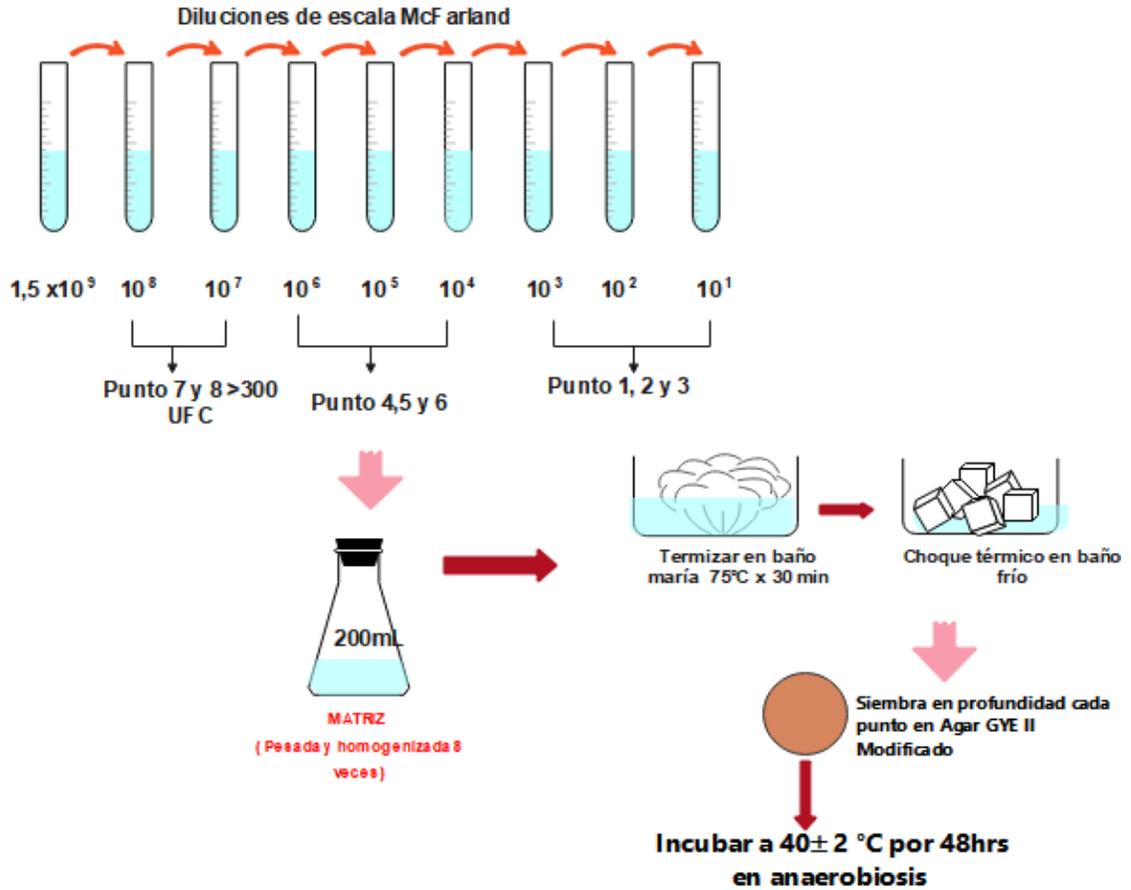
Seis de los puntos (6) entran en el rango y dos puntos (7 y 8) están por encima del límite que se puede contar (30 UFC – 300 UFC). Esto representa el valor respuesta (Y).

Paralelamente se inocularon a los mismo niveles ocho suspensiones de *Bacillus coagulans* en diluyente peptona al 0,1 %. Esto representa el valor señal (X)

Todas las muestras se termizaron y se sometieron a choque térmico a las condiciones descritas en el numeral 5.2.1

Finalmente, se sembraron en Agar GYE II Modificado e incubaron siguiendo el método de referencia en el numeral 5.2.3

Ilustración 2. Esquema metodológico del ensayo del parámetro estadístico "Linealidad".



- **Determinación de Inclusividad**

Se sembró 10 réplicas de un blanco fortificado con microorganismo *Bacillus coagulans* otorgada por el laboratorio *Merieux Nutriscience*. Las concentraciones fueron a nivel medio entre (15 UFC a 20 UFC)

- **Determinación de Exclusividad**

Se sembraron 10 réplicas de un blanco fortificado con otra especie de microorganismo como *Lactobacillus acidophilus* en concentraciones medias (15 UFC - 20 UFC).

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 4. Cronograma de actividades realizadas.

ACTIVIDAD	Febrero					Marzo					Abril					Mayo					Junio				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Capacitación de labores en la empresa																									
Entrenamiento por parte del analista de muestras ambientales																									
Acompañamiento en el procesamiento de muestras ambientales																									
Entrenamiento y acompañamiento por parte del analista de muestras Farma y cosméticos																									
Entrenamiento y acompañamiento en el procesamiento de muestras de alimentos																									
Acompañamiento en el área de validaciones																									

7. RESULTADOS

7.1. DETERMINACIÓN DE EXACTITUD DEL MÉTODO

A continuación, se muestra la tabla de resultados obtenidos del recuento en placa en agar GYE II modificado para determinar el parámetro de exactitud de cada matriz analizada. Los recuentos están dados en logaritmo base 10 UFC/g ó mL.

Tabla 5. Determinación de la exactitud (porcentaje de recuperación relativa) en cada matriz analizada, Matriz 1 Saviloe; Matriz 2 Galletas; Matriz 3 Azúcar; Matriz 4 Helado.

	Matriz 1				Matriz 2		
	Concentración alta UFC/mL	Concentración med UFC/mL	Concentración baja UFC/mL		Concentración alta UFC/g	Concentración med UFC/g	Concentración baja UFC/g
Valor experimental	1,82	1,24	0,85	Valor experimental	1,82	1,26	0,85
Valor verdadero	1,88	1,20	0,80	Valor verdadero	1,90	1,20	0,80
% recuperación	96,85871206	102,8869304	105,4221482	% recuperación	96,11523514	104,248125	105,4221482
	Matriz 3				Matriz 4		
	Concentración alta UFC/g	Concentración med UFC/g	Concentración baja UFC/g		Concentración alta UFC/g	Concentración med UFC/g	Concentración baja UFC/g
Valor experimental	1,92	1,29	0,60	Valor experimental	1,90	1,28	0,67
Valor verdadero	1,88	1,20	0,80	Valor verdadero	1,88	1,20	0,80
% recuperación	101,9415446	107,4420137	75,10425373	% recuperación	101,0879895	106,1981878	83,45556215

La exactitud analizada se determinó como porcentaje de recuperación relativa de *Bacillus coagulans* para cada matriz alimentaria.

Este estadístico se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{X_1}{X_0} * 100$$

Donde X_0 = Valor verdadero, X_1 = Valor experimental.

De acuerdo a los valores del porcentaje de recuperación relativa (Tabla 5) se evidenció que las matrices 1 (Saviloe), matriz 2 (Galletas), la matriz 3 (azúcar) y matriz 4 (Helado) en cada nivel de concentración de *Bacillus coagulans* resultaron óptimos, debido a que permite recuperar más del 70 % del microorganismo. Algunas matrices evidencian un porcentaje de recuperación relativa que supera el 100 %. Estos valores cumplen con el criterio de aceptación de la USP 2021 que indica que el porcentaje de recuperación relativa debe ser \geq del 70 %. Asimismo, cada valor experimental tiende a acercarse al valor real lo que indica que los resultados tienden a ser exactos al aplicar la metodología propuesta en esta investigación.

7.2. DETERMINACIÓN DE PRECISIÓN

A continuación, se muestra la tabla de resultados para el ensayo de repetibilidad del método analítico realizado por un mismo analista seis veces seguidas bajo las mismas condiciones.

Tabla 6. Determinación del parámetro de repetibilidad del método analítico por un analista seis veces repetidas.

Precisión							Repetibilidad en Log UFC/mL
Repeticiones	1	2	3	4	5	6	
Analista 1	1,11	1,15	1,26	1,11	1,26	1,18	Precisión intermedia en Log UFC/mL
	Día 1			Día 2			
Analista 1	1,11	1,15	1,08	1,15	1,11	1,20	Precisión intermedia en Log UFC/mL
Analista 2	1,20	1,23	1,11	1,18	1,26	1,23	

La precisión (repetibilidad) se determinó como porcentaje de coeficiente de variación de los datos obtenidos a partir de los recuentos en placa en Log₁₀ de UFC mediante la siguiente ecuación:

$$\% CV = \frac{S}{X} * 100$$

Donde S= Desviaciones estándar, X = Media de los datos.

Reemplazando cada valor estadístico:

$$\% CV = \frac{0,065}{1,18} * 100 = 5 \%$$

El porcentaje coeficiente de variación para el analista 1 dio como resultado 5 % cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por USP 2021 el cual debe ser ≤ 10 %. Esto indica una baja desviación estándar en las seis repeticiones y una alta precisión en los recuentos obtenidos por un mismo analista ya que cada dato tiende a coincidir el uno con el otro.

7.2.1. PRECISIÓN INTERMEDIA

A continuación se muestra los resultados obtenidos para el parámetro de precisión intermedia.

Tabla 7. Precisión intermedia evaluada para dos analistas en días diferentes.

PRECISIÓN INTERMEDIA EN LOG UFC/mL DEL ANALISTA 1			PRECISIÓN INTERMEDIA EN LOG UFC/mL DEL ANALISTA 2		
	REPETICIONES	RESPUESTA		REPETICIONES	RESPUESTA
Día 1	Repetición 1	1,11	Día 1	Repetición 1	1,20
	Repetición 2	1,15		Repetición 2	1,23
	Repetición 3	1,08		Repetición 3	1,11
Día 2	Repetición 1	1,15	Día 2	Repetición 1	1,18
	Repetición 2	1,11		Repetición 2	1,26
	Repetición 3	1,2		Repetición 3	1,23
	PROMEDIO	1,133		PROMEDIO	1,202
	DESVESTA	0,042		DESVESTA	0,053
	% CV	3,730		% CV	4,385

La precisión intermedia indicó el porcentaje del coeficiente de variación entre los dos analistas.

El coeficiente de variación obtenido para el analista 1 y 2 cumple con el criterio de aceptación, el cual establece que el porcentaje de variación para los dos analistas deben ser $\leq 15 \%$ (USP, 2021) dando un valor del 3,730 % y 4,385 % respectivamente. Por lo tanto, los resultados tienden a coincidir para los dos analistas obteniéndose una alta precisión y poca variabilidad en los datos.

7.2.2. PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)

Tabla 8. Precisión en términos de reproducibilidad del método analítico llevado a cabo por dos Analistas en diferentes días.

REPRODUCIBILIDAD EN LOG UFC/mL		
	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	Respuesta	Respuesta
PROMEDIOS DIA 1	1,114	1,204
	1,146	1,230
	1,079	1,114
PROMEDIOS DIA 2	1,146	1,176
	1,114	1,255
	1,204	1,230
PROMEDIO	1,134	1,202
DESVIACION ESTANDAR (S)	0,042	0,051
VARIANZA S	0,002	0,003
% CV	3,745	4,211
% CV GOLBAL	4,322	

La comparación entre el analista 1 y analista 2 permitió determinar el valor de reproducibilidad que también es expresada como coeficiente de variación global con un valor de 4,322 cumpliendo así con el criterio de aceptación $\leq 15 \%$ (USP, 2021).

7.3. DETERMINACIÓN DE LINEALIDAD

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la determinación del parámetro estadístico linealidad.

Tabla 9. Determinación de la linealidad en log UFC/mL de ocho niveles de concentración de *Bacillus coagulans*.

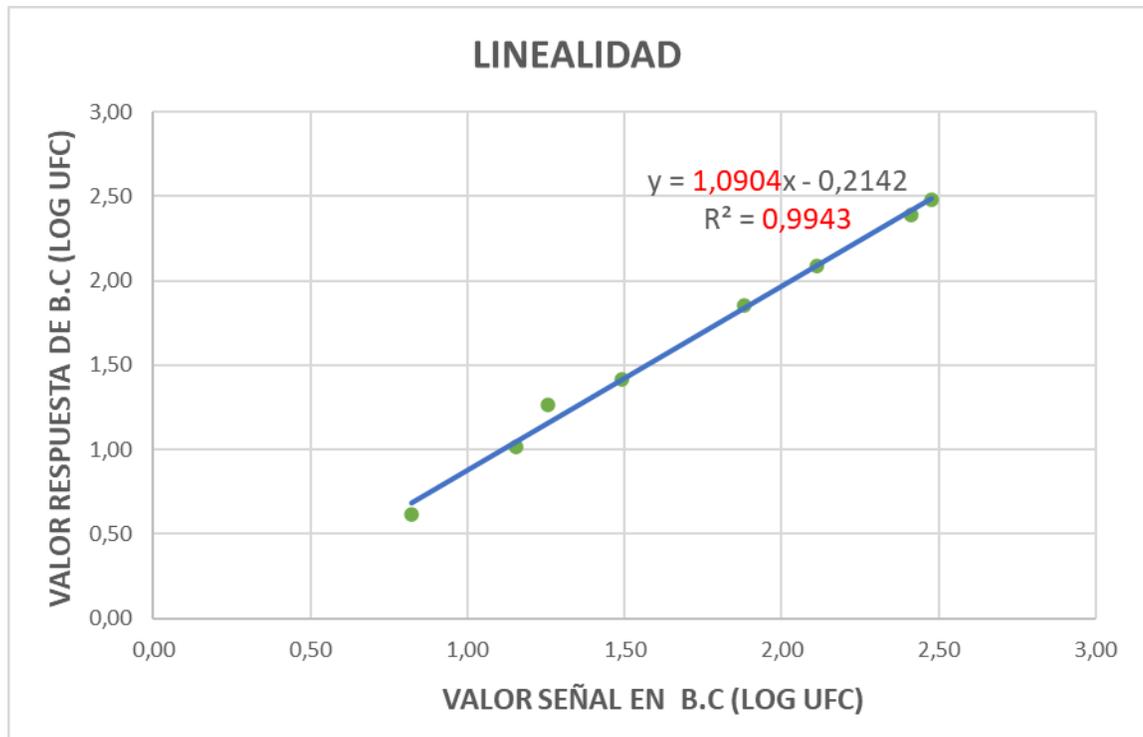
LINEALIDAD EN LOG UFC/mL								
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6	Punto 7	Punto 8
Valor señal (X)	0,823908 741	1,15634 72	1,25527 251	1,49136 169	1,87890 46	2,11058 971	2,41385 834	2,95424 251
Valor respuesta (Y)	0,636822 098	1,01424 044	1,26324 143	1,41497 335	1,85531 721	2,08872 656	2,38975 656	2,95424 251

La linealidad de los datos obtenidos demuestra que sí existe una correlación entre los recuentos obtenidos cuando se contamina una matriz con *Bacillus coagulans* a ocho niveles de concentración frente a otras muestras que poseen el microorganismo en un diluyente sin interferencias como peptona 0,1 % a los mismos ocho niveles de concentración y bajo la misma metodología.

La ilustración 3 obtenida permite interpretar que la relación entre las dos variables (X como señal, Y como respuesta) es positiva y directa, a medida que aumenta una de ellas la otra también asciende.

La linealidad de los datos cumple con los criterios de aceptación donde R^2 debe acercarse a +1 dando un valor de 0,9943.

Ilustración 3. Linealidad de los datos en ocho puntos de dopaje la muestra a diferentes concentraciones de *Bacillus coagulans*.



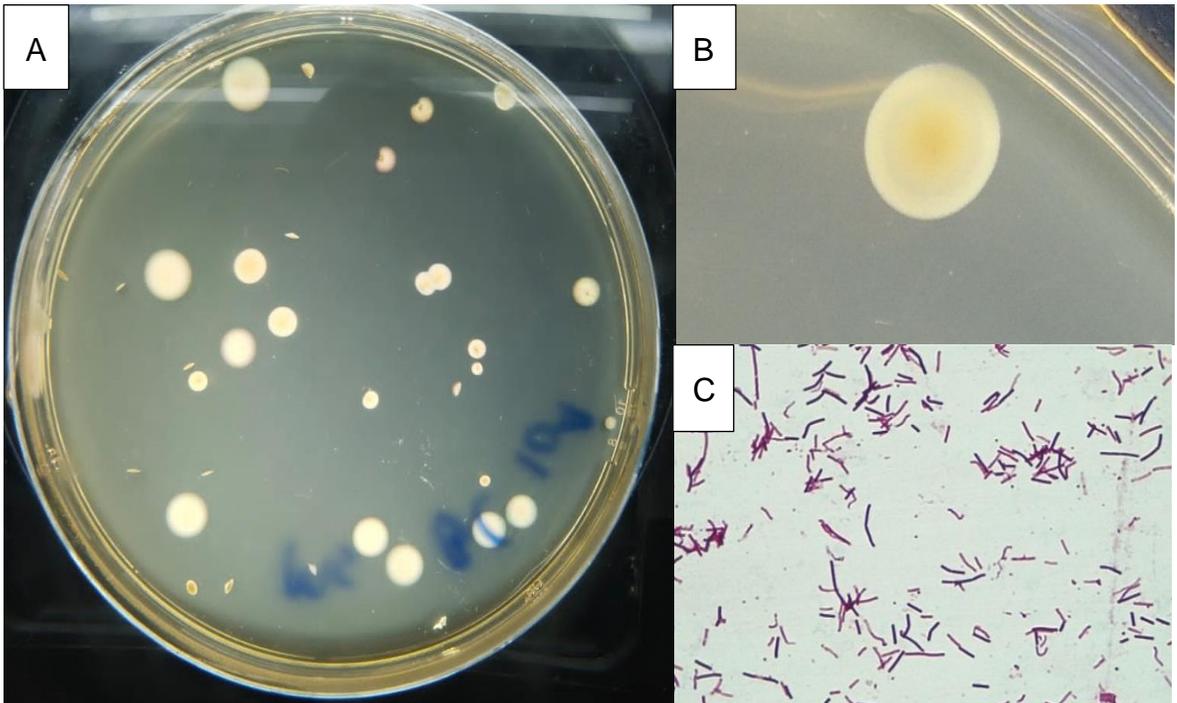
7.4. DETERMINACIÓN DE INCLUSIVIDAD

La inclusividad del método analítico para recuperar *Bacillus coagulans* en las matrices evaluadas resulta satisfactoria. El análisis de inclusividad resulta ser meramente cualitativo ya que se determinó la capacidad del microorganismo de desarrollarse efectivamente en el medio agar GYE II modificado (Imagen 1.A).

Macroscópicamente se obtuvieron colonias características de *Bacillus coagulans* como se muestra en la imagen 1.B. Estas son superficiales, con 0,5 mm a 1 mm de diámetro, de color blanco a crema, convexas, con márgenes completos y superficies lisas. (Farmacopea USP, 2022).

La microscopía llevada a cabo por tinción Gram permite evidenciar bacilos Gram positivos.

Ilustración 4. Macroscopía y microscopía de *Bacillus coagulans*. (A,B) Colonias características en agar GYE II modificado: Grandes, circulares, borde entero, de color crema.(C). Bacilos gram positivos.

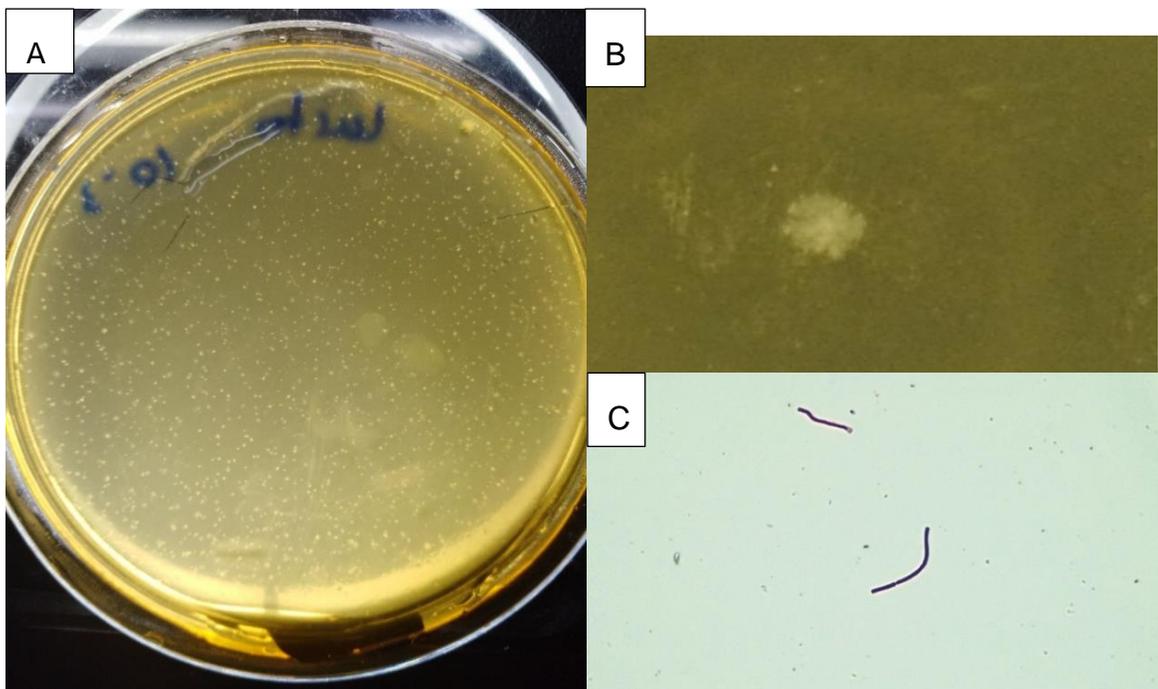


7.5. DETERMINACIÓN DE EXCLUSIVIDAD

La exclusividad evaluada se determinó de manera cualitativa. Se muestra la capacidad de detectar y diferenciar al microorganismo *Lactobacillus acidophilus* que crece diferente a *Bacillus coagulans* y que podría presentar interferencia. Sin embargo, durante el desarrollo del trabajo este microorganismo no crece, en principio porque los productos son contaminados únicamente con una cepa pura de *B. coagulans*.

Las colonias típicas de *Lactobacillus acidophilus* se evidencian en la Imagen son pequeñas (0,2 mm a 2,5 mm), blancas opacas, sin ningún pigmento, con bordes irregulares. (Farmacopea USP, 2022).

Ilustración 5. Macroscopía y microscopía *Lactobacillus acidophilus* en agar GYE II Modificado (A y B) Colonias características pequeñas, blancas, opacas e irregulares. (C) Bacilos Gram positivos.



8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE EXACTITUD

Los resultados obtenidos de los recuentos de *Bacillus coagulans* en las diferentes matrices demuestran que el método analítico permite recuperar el microorganismo en los tres niveles de concentración cumpliendo con los criterios de aceptación de la USP 2021.

Esto indica que al aplicar el método analítico propuesto es posible recuperar más del 70 % del microorganismo y otorgar recuentos exactos de *Bacillus coagulans* a partir matrices alimentarias. La exactitud en el recuento podría sugerir que el microorganismo de cierta manera no es inhibido durante alguna etapa en desarrollo del método. Para el caso de la matriz 3 (Azúcar) y la matriz 4 (Helado) presentan un recuento menor respecto a las demás cuando el nivel de concentración es bajo, sin embargo, cumple con el criterio de aceptación. Esto podría asociarse a algún efecto de la matriz sobre la estabilidad del microorganismo pueden ser conservantes, carbohidratos, aditivos etc, los cuales deben analizarse a detalle en otros estudios (Cabanillas L., 2017)

8.2. RESULTADOS DE PRECISIÓN EN TÉRMINOS DE REPETIBILIDAD, PRECISIÓN INTERMEDIA Y REPRODUCIBILIDAD

La repetibilidad obtenida para un analista (Analista 1) se ajusta al criterio de aceptación ($\leq 10\%$) dando un valor del 5 % por tanto los datos son consistentes e indican una baja variabilidad o poca dispersión entre ellos en las seis repeticiones respecto a lo permitido.

Pueden existir algunos factores que pueden afectar la precisión (repetibilidad) por lo que el analista debe tener cuidado a la hora de procesar. Dichos factores pueden ser: la experiencia del investigador, la medida que se debe tomar y la calibración del instrumento de medición. (Ministerio de Economía, fomento y Turismo de Chile, 2018).

La precisión intermedia y reproducibilidad obtenida en la validación del método analítico para cuantificar *Bacillus coagulans* es óptima, esto podría indicar que puede llevarse a cabo rutinariamente por diferentes analistas en diferentes días cada uno con su propia experticia logrando obtener una alta precisión. Sin embargo aunque la experiencia técnica sea diferente entre analistas, se debe asegurar que el procesamiento siempre se realice bajo Buenas Prácticas de Laboratorio para así mantener resultados satisfactorios y confiables.

8.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD

El análisis de la linealidad se determinó a partir de la gráfica obtenida ya que permite analizar mejor los datos. De acuerdo a esta, es posible considerar que el método analítico en ocho concentraciones de *Bacillus coagulans* tiene como respuesta una relación directamente proporcional respecto a las concentraciones buscadas del microorganismo como valor señal.

La relación lineal se confirma porque cumple con el criterio de aceptación teniendo en cuenta su coeficiente de correlación elevado que es 0,9998. Esto indica que el método evaluado permite cumplir con los fines previstos para realizar un recuento confiable de *Bacillus coagulans* a partir de alimentos.

8.4. RESULTADOS DE EXCLUSIVIDAD E INCLUSIVIDAD

El crecimiento inclusivo de *Bacillus coagulans* en agar GYE II permite demostrar que es posible recuperar el microorganismo y que este se desarrolla satisfactoriamente formando sus colonias características. Este crecimiento evidencia que otras sustancias en la matriz alimentaria no interfiere a grandes rasgos en su crecimiento. Asimismo, el medio de cultivo es exclusivo porque especies de microorganismo similares a *Bacillus coagulans* como lo es *Lactobacillus acidophilus* una bacteria probiótica, Gram positiva no formadora de spora, ácido láctico, es posible ser diferenciada macroscópicamente en el medio de cultivo agar GYE II de *Bacillus coagulans*.

El medio GYE II modificado (Agar extracto de levadura con glucosa) se utiliza generalmente para el recuento de Lactobacilos en preparaciones farmacéuticas. En alimentos se usa para el aislamiento de bacterias mesófilas, termófilas al promover la esporulación. El Hierro y los sulfatos de manganeso mejoran la esporulación en las especies de *Bacillus* spp. (Liofilchem,2016)

Este medio contiene sales como sulfatos para apoyar el crecimiento de los microorganismos evaluados, contienen nutrientes, aminoácidos y vitaminas esenciales proporcionados por la peptona y extracto de levadura. La glucosa es la fuente de carbohidratos. Las sales metálicas son los iones esenciales para la producción de ácido láctico. (*Thomas Scientific*, 2015)

9. CONCLUSIONES

El método de referencia aplicado en este análisis permite alcanzar los fines previstos de la validación otorgando un recuento confiable de *Bacillus coagulans* en las cuatro matrices alimentarias seleccionadas debido a que dicha metodología se encuentra estandarizada por la Farmacopea Estadounidense quienes manejan altos estándares de calidad en sus métodos analíticos.

El proceso de validación confirmó que el método analítico para la cuantificación de *Bacillus coagulans* en matrices alimentarias como : bebidas azucaradas, galletas, azúcar y helado puede ejecutarse rutinariamente en el laboratorio de microbiología porque de acuerdo a los datos estadísticos analizados se cumple con todos los criterios de aceptación pues logra recuperarse más del 70 % del probiótico dando recuentos precisos y exactos en diferentes concentraciones del microorganismo.

La recuperación del probiótico en agar GYE II Modificado es satisfactoria y logra desarrollarse formando colonias típicas, esto podría indicar que los componentes de las matrices analizadas no representaron interferencia que inhibiera el microorganismo a lo largo de las etapas del proceso de validación pues se obtuvo un buen crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo.

10.RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Para futuras verificaciones del método analítico para el recuento de *Bacillus coagulans* en alimentos, se sugiere realizar el análisis contaminando intencionalmente las muestras pues muchas veces la concentración del microorganismo no se especifica en la etiqueta y es posible que se obtenga recuentos en placa elevados e incontables.

Se sugiere analizar a fondo la relación que puede tener la matriz alimentaria sobre el crecimiento y estabilidad del probiótico en el alimento.

La aplicación del método analítico debe llevarse a cabo bajo buenas prácticas de manufactura y buenas prácticas de laboratorio, por analistas capacitados y con equipos debidamente calibrados de manera que se logre dar resultados confiables acerca de concentración real del probiótico presente en el alimento que se va a comercializar.

11. GLOSARIO

Agar GYE: Es un medio selectivo que se emplea para el recuento de *Bacillus coagulans*, en productos que presenten este microorganismo.

***Bacillus coagulans*:** Es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas, productora de ácido láctico, con forma de bastoncillo, que es aeróbica a microaerófilo

Estandarización o Evaluación del desempeño del método: Verificación de la capacidad del método para cumplir de forma satisfactoria con todos los requisitos establecidos para el mismo.

Incertidumbre de la medición: Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos a la magnitud a medir.

Linealidad: capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo determinado.

Material (patrón) de referencia: Material o sustancia del cual uno o más de sus valores propios son suficientemente homogéneos y están bien establecidos para ser usados para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o para la asignación de valores a los materiales.

Muestra adicionada (fortificada): Muestra del producto a ser analizada y la cual es adicionada con una cantidad conocida del analito en estudio.

Plan de validación: Documento que describe los ensayos que deben ser validados y/o estandarizados en un período determinado.

Protocolo de validación: Conjunto de instrucciones por escrito cuyo alcance es mayor que el de un procedimiento normalizado de operación, y que describe detalladamente todos los pasos a seguir para verificar un ensayo.

Trazabilidad: Capacidad para seguir la historia, la aplicación o la localización de todo aquello que está bajo consideración.

Validación: Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

12. BIBLIOGRAFIA

Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos y la Organización mundial de la salud FAO/OMS, (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.

Beltrán M (2016). Alimentos Funcionales. Revista Farmacia Profesional. Vol 30. Pg 12-14. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-X0213932416546681>

Benjamin Caballero (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Pages 2827-2832, ISBN 9780122270550, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01328-6>.

Cabanillas M (2017). Incorporación de *Bacillus coagulans* a productos derivados de cereales. Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/457965/mlcl1de1.pdf?sequence=1>

Cencic A, Chingwaru W (2020). The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journals.Nutrients.

Codex Alimentarius commission, FAO/OMS (2019). Discussion paper on harmonized probiotic guidelines for use in foods and dietary supplements. Recuperado de: <https://isappsscience.org/harmonized-probiotic-guidelines-to-be-discussed-at-codex-alimentarius-meeting-november-24-29/>

Comitte ISO/TC 34/SC 9/WG 3 (2021). Overview of the ISO 16140 Series Standars for Validation and Verification of Microbiology Methods.

Emad Abd El-moniem Abada (2008). Isolation and characterization of a antimicrobial compound from *Bacillus coagulans*, Animal Cells and Systems, 12:1, 41-46, DOI: 10.1080/19768354.2008.9647152

Endres JR. Clewell A, Jade K, Farber T, Hauswirth J, Schauss A. (2009). Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, *Bacillus coagulans*, as

a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 47, Issue 6, Pages 1231-1238, doi <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.018>.

Elahi, B., Nikfar, S., Derakhshani, S (2008). On the Benefit of Probiotics in the Management of Pouchitis in Patients Underwent Ileal Pouch Anal Anastomosis: A Meta-analysis of Controlled Clinical Trials *Dig Dis Sci* 53, 1278–1284 <https://doi.org/10.1007/s10620-007-0006-z>

Farmacopea Estadounidense (2015). Guide to USP- Speak. Clear definitions of USP terms and abbreviations for Dietary Supplement and herbal Medicines. Version 10. Recuperado de, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/DS/glossary-of-usp-terms.pdf>

Farmacopea USP (2019). An Overview of USP Monographs. Recuperado de : <https://www.usp.org/about/public-policy/overview-of-monographs>

Feldsine, Abeyta, Andrews (2002). AOAC International. Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *Journal of AOAC International*. VI 85, No 5. Recuperado de <https://academic.oup.com/jaoac/article/85/5/1187/5656729?login=false>

Food and Drug Administration (2022). What's is a dietary Supplement. Recuperado de: <https://www.fda.gov/food/information-consumers-using-dietary-supplements/questions-and-answers-dietary-supplements>

Food and Drug Administration (FDA) (2019). GRAS Notification for the intended use of *Bacillus coagulans* SNZ 1969 spores' preparation in Infant Formula. Recuperado de <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-notice-inventory>

Jiang Cao, Zhiming Yu, Wenyin Liu, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Qixiao Zhai, Wei Chen, (2020) Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103643>

Konuray, G., Erginkaya, Z (2018). Potential Use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(6), 92. <https://doi.org/10.3390/foods7060092>

Konuray G, Erginkaya Z (2020). Quality evaluation of probiotic pasta produced with *Bacillus coagulans* GBI-30, Innovative Food Science & Emerging Technologies, volume 66, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102489dfv>

Konuray, Erginkaya Z (2021). Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. LWT, ScienceDirect, Volume 151, DOI <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112233>.

Kapse NG, Engineer AS, Gowdaman V, Wagh S, Dhakephalkar PK (2019). Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. Genomics.;111(4):921-929. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.05.022. Epub 2018 May 30. PMID: 29859262.

Liofilchem (2016) Glucose Yeast Extract Agar. Medium for detection, cultivation and enumeration of spore-forming organisms. Technical sheet. Recuperado de: http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/26473_TS.pdf

Majeed, M., Nagabhushanam, K., Natarajan, S. Sivakumar A, et al (2016). Evaluation of genetic and phenotypic consistency of *Bacillus coagulans* MTCC 5856: a commercial probiotic strain. World J Microbiol Biotechnol 32. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2027-2>

Magnusson B, Örnemark U (2016). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

Misiou O, Zourou C, Koutsoumanis K (2021). Development and validation of a predictive model for the effect of temperature, pH and water activity on the growth kinetics of *Bacillus coagulans* in non-refrigerated ready-to-eat food products, Food Research International, Volume 149,

Ministerio de la protección social (2006). Decreto 3249. Por el cual se reglamenta la fabricación, comercialización, envase, rotulado o etiquetado, régimen de registro sanitario, de control de calidad en los suplementos dietarios

Ministerio de salud y protección social Resolución 1160 (2016) Por la cual se establecen los Manuales de Buenas Prácticas de Manufactura y las Guías de inspección de Laboratorios o Establecimientos de Producción de medicamentos, para la obtención del Certificado de Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura.

Ministerio de salud y protección social (2001). Decreto 549. por el cual se establece el procedimiento para la obtención del certificado de cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura por parte de los laboratorios fabricantes de medicamentos que se importen o produzcan en el país".

Mackowiak P. A. (2013). Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in public health*, 1, 52. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>

Ministerio de Economía, Fomento y Turismo de Chile(2018). Guía de Validación de Métodos analíticos. Manual de Inocuidad y Certificación. Recuperado de: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/f59_guia_de_validaciones_de_metodos_analiticos_08.02.18.pdf

National Institutes of Health (2020). Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. Recuperado de <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-Consumer/>

The FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee (2019). Guidelines for the Validation of Microbiological Methods for the FDA Foods Program, 3rd Edition. Recuperado de: <https://www.fda.gov/media/83812/download>

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y La Alimentación FAO/OMS (2006) Probióticos en los alimentos, Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Recuperado de <https://www.fao.org/publications/card/en/c/7dccb60a-88be-53fa-9c77-6f81b7ca368>

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In: Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schasfsma, G. (eds) *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer, Doi. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_18

Ramirez J, Parra J, Alvarez A (2017) Análisis de técnicas de recuento de microorganismos. *Revista Unilibre*. España. Vol 6. Doi https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665

Reyes A, Chiluita P, Argüello P (2017). Probióticos y Prebióticos: Una revisión de la normativa internacional. A review of international regulations. Revista Perspectiva 18 (2) UPAGU. pg 158-167.

Sanders M (2019). Harmonized Probiotic Guidelines to be discussed at Codex Alimentarius meeting November 24 – 29. Recuperado de <https://isappscience.org/harmonized-probiotic-guidelines-to-be-discussed-at-codex-alimentarius-meeting-november-24-29/>

Superintendencia de Industria y comercio de Colombia (2014) Boletín tecnológico Alimentos funcionales con Probióticos. Banco de patentes SIC. Recuperado de https://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/alimentos_probioticos.pdf

Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 17, 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>

Salveti, E., Orrù, L., Capozzi, V.(2016). Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. Apply Microbiol Biotechnol 100, 4595–4605.

Sutton S (2011). "Accuracy of plate counts." Journal of Validation Technology, vol. 17, N° 3. Recuperado de <https://documents.pub/document/accuracy-of-plate-counts-the-microbiology-topics-scott-sutton-accuracy-of-plate.html>

Télessy István (2019). The Role of Functional Food Security in Global Health, Academic Press, Pages 409-421, DOI(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128131480000244>)

The Science Source for food, Agricultural, and Environmental Issues (2007). Probiotics: Their Potential to Impact Human Health Recuperado de <https://www.cast-science.org/publication/probiotics-their-potential-to-impact-uman-health/>

Thomas Scientific. (s.f). Glucose Yeast Extract Agar Himedia. Recuperado de https://www.thomassci.com/Laboratory-Supplies/Microbiological-Media/_/Glucose-Yeast-Extract-Agar

United States Pharmacopeia, USP (2022). Dietary Supplement Monographs, *Bacillus coagulans*. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia. Doi: https://doi.org/10.31003/USPNF_M10777_06_01

United States Pharmacopeia, USP (2022). Dietary Supplement Monographs, *Bacillus coagulans* Capsules. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia Doi: https://doi.org/10.31003/USPNF_M11075_06_01

Umar Meleh, Sulin Choo, Mohd Nasir Mohd Desa, Shu Yih Chew, Premmala Rangasamy, Haslinda Hassan, Leslie Thian Lung Than, Isolation and safety characterisation of *Lactobacilli* strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use, Volume 131, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109796>. Smedt J, (1998). AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods, International Journal of Food Microbiology, Volume 45, Doi [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00143-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00143-3).

Farmacopea Estadounidense, USP (2021). <1223> Validation of alternative microbial methods

USP (2021) <1225> Validation of compedial procedures. Recuperado de <https://latam-edu.usp.org/wp-content/uploads/2021/08/1225.pdf>

Yoo SJ (2017) Updates on USP Standards for Probiotics. U.S Pharmacopeial Convention. Recuperado de <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/get-involved/stakeholder-forums/3c-updates-usp-standards-probiotics-2017-06-07.pdf>

Zawistowska A, Zaręba T, Mrówka A, Tyski S, (2015) Assessment of the microbiological status of probiotic products. Polish Journal of Microbiology. <http://www.pjmonline.org/assessment-of-the-microbiological-status-of-probiotic-products/>

ANEXOS

Anexo A. Tabla de recolección de datos en bruto del recuento en placa de *Bacillus coagulans* en Agar GYE II Modificado.

	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6	Punto 7	Punto 8	Linealidad
Valor señal (X)	6	12	17	32	76	124	270	>300	
	7	15	18	31	74	135	248	>300	
	7	16	19	30	77	128	260	>300	
Valor respuesta (Y)	3	10	17	28	78	128	244	>300	
	4	11	20	24	72	124	248	>300	
	6	10	18	26	65	116	244	>300	

Precisión							Repetibilidad
Repeticiones	1	2	3	4	5	6	
Analista 1	13,00	14,00	18,00	13,00	18,00	15,00	Precisión intermedia
Analista 1	13,00	14,00	12,00	14,00	13,00	16,00	Precisión intermedia
Analista 2	16,00	17,00	13,00	15,00	18,00	17,00	

		Exactitud					Exactitud		
		Matriz 1					Matriz 2		
		Concentración alta	Concentración media	Concentración baja			Concentración alta	Concentración media	Concentración baja
Valor experimental	Valor	74,00	16,00	8,00	Valor experimental	Valor	63,00	18,00	8,00
		56,00	19,00	8,00			58,00	19,00	7,00
		69,00	17,00	5,00			79,00	17,00	6,00
Valor verdadero	Valor	76,00	16,00	4,00	Valor verdadero	Valor	76,00	16,00	4,00
		72,00	15,00	7,00			72,00	15,00	7,00
		80,00	17,00	8,00			89,00	17,00	8,00
		Exactitud					Exactitud		
		Matriz 3					Matriz 4		
		Concentración alta	Concentración media	Concentración baja			Concentración alta	Concentración media	Concentración baja
Valor experimental	Valor	82,00	19,00	4,00	Valor experimental	Valor	76,00	18,00	4,00
		84,00	18,00	5,00			81,00	19,00	3,00
		82,00	22,00	3,00			82,00	20,00	7,00
Valor verdadero	Valor	76,00	16,00	4,00	Valor verdadero	Valor	76,00	16,00	4,00
		72,00	15,00	7,00			72,00	15,00	7,00
		80,00	17,00	8,00			80,00	17,00	8,00

Anexo B. Instructivo técnico para el recuento de *Bacillus coagulans* en Alimentos. Merieux Nutriscience.

	RECUESTO DE <i>Bacillus coagulans</i> (<i>Lactobacillus sporogenes</i>)	Código IN-GS-4.103
		Versión 4
		Página 1 de 8

1. OBJETIVO

Describir los procedimientos necesarios para llevar a cabo el Recuento de *Bacillus coagulans* UFC/ g o mL en alimentos para consumo humano.

2. ALCANCE

Este instructivo aplica para realizar el recuento de *Bacillus coagulans* UFC/ g o mL en Leches y productos lácteos sometidos a tratamientos térmicos, Chocolate, productos de panadería y pastelería analizados en el laboratorio Merieux Nutrisciences-Tecnimicro sede Medellín

3. HISTORIAL DE REVISIONES

Versión	Fecha	Comentarios
2	2017-03-24	Se mejoró la redacción del campo de referencias
3	2019-04-26	Se ajustó la estructura de acuerdo con PD-GE-2.001 Se adicionó el diagrama de flujo del proceso
4	2022-06-03	Se validó y ajustó la metodología permitiendo así unificar el protocolo para ser aplicable en diferentes matrices alimentarias

4. TÉRMINOS Y DEFINICIONES

Término	Definición
<i>Bacillus coagulans</i>	Bacteria, grampositiva, formadora de esporas, productora de ácido láctico, con forma de bastoncillo y anaerobia facultativa. Anteriormente llamada <i>Lactobacillus sporogenes</i> . Sin embargo, en la séptima edición del Manual de Bacteriología de Bergey fue denominada <i>Bacillus coagulans</i> debido a la simplificación en la catalogación. Este microorganismo es ampliamente usado como probiótico al que se le atribuye grandes beneficios a la salud gastrointestinal, inmunitarios y la capacidad de equilibrar la microbiota intestinal en humanos y animales.

Anexo C. Metodología De Referencia Para El Recuento *Bacillus coagulans* en suplementos dietéticos (Farmacopea, 2022)

